

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公表

⑫ 公表特許公報(A)

昭64-500369

⑬ 公表 昭和64年(1989)2月9日

⑭ Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

審査請求 未請求

予備審査請求 未請求

部門(区分) 6(1)

G 01 N 33/53

C 12 M 1/34

G 01 N 33/80

K-7906-2G

F-8717-4B

8305-2G

(全 11 頁)

⑮ 発明の名称 細胞検出システム及び方法

⑯ 特 願 昭62-502892

⑰ 出 願 昭62(1987)4月14日

⑱ 翻訳文提出日 昭63(1988)1月21日

⑲ 国際出願 PCT/US87/00838

⑳ 国際公開番号 WO87/07304

㉑ 国際公開日 昭62(1987)12月3日

優先権主張 ㉒ 1986年5月22日 ㉓ 米国(US) ㉔ 866,350

⑳ 発 明 者 ヒューイット, ゲーリー エベ アメリカ合衆国, カリフォルニア 94025, アサトン, モールトン
レット ドライブ 57

㉑ 出 願 人 ジェネラプス インコーポレイ アメリカ合衆国, カリフォルニア 94063, レッドウッド シテ
テイド イ, ペノブスコット ドライブ 505

㉒ 代 理 人 弁理士 青 木 朗 外3名

㉓ 指 定 国 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), CH(広域特許), DE(広域特許), FR(広域特許), GB(広域特許), IT(広域特許), JP, KR, LU(広域特許), NL(広域特許), SE(広域特許)

請 求 の 範 囲

1. 膜と溶液中の細胞とを接触せしめるのに使用するために調節された毛管現象を有する構造体であって:

a) 多孔性膜表面;

b) 前記膜表面と前記細胞とを効果的に接触せしめるために十分な、調節された速度で前記溶液を導入することができる多孔性内部を含んで成る構造体。

2. 前記膜表面及び前記多孔性内部が異なった材料から構成される請求の範囲第1項記載の構造体。

3. 前記膜表面及び前記多孔性内部が同じ材料から構成される請求の範囲第1項記載の構造体。

4. 前記膜が、操作の間、膜のトポロジーを維持することができる支持体手段に取り付けられる請求の範囲第3項記載の構造体。

5. 前記細胞が次のもの: 赤血球細胞、白血球細胞、組織培養細胞又は完全な血液の1つである請求の範囲第4項記載の構造体。

6. 前記細胞がヒト赤血球細胞である請求の範囲第5項記載の構造体。

7. 約5ミクロンよりも小さな孔サイズを有する、非-細胞破壊性膜表面を有する前記膜表面;

前記膜表面と接触される液体サンプルを該膜表面を通して吸い込むための調節された毛管現象を有す

る前記内部膜; 及び

サンプルが膜に対して配置され、そして赤血球細胞がその膜に対して吸い取られる場合、選択された型の血液サンプル中の赤血球細胞を免疫特異的に結合することができる表面配列の型特異的の抗体を付着された前記膜表面を、赤血球細胞の型を検出するのに使用するために含んで成る請求の範囲第6項記載の構造体。

8. 前記内部の液体容量が、前記膜表面上に免疫特異的に結合された赤血球細胞の見える層を形成するのに必要な赤血球細胞の少なくとも必要な数を含む血液サンプルの体積を前記膜を通して吸収するのに十分である請求の範囲第7項記載の構造体。

9. 水性アッセイ媒体によりN倍に希釈された血液サンプル中の血液型を決定するために、前記膜及び関連する内部が、少なくとも約N×20ミクロンの厚さを有する単位構造体として形成される請求の範囲第8項記載の構造体。

10. 前記膜が次のもの: PVDF, PTFE, 変性されたナイロンニトロセルロース、再生されたセルロース、又はセルロースの1つから成るポリマー繊維から構成される請求の範囲第8項記載の構造体。

11. 前記膜表面が実質的に電荷されていない請求の範囲第10項記載の構造体。

12. 前記抗体が前記膜表面に吸着により付着されている請求の範囲第7項記載の構造体。

13. 前記抗体が前記膜表面に共有結合されている請求の範囲第7項記載の構造体。

14. 前記膜表面及び内部がPVDF繊維の単位膜として形成され、そして前記抗体がカルボジイミソールカップリング剤により前記膜表面に結合される請求の範囲第13項記載の構造体。

15. 前記抗体を、抗-A、抗-B及び抗-D抗体から成る群から選択する請求の範囲第7項記載の構造体。

16. 前記抗体が免疫グロブリンM抗-ヒトDモノクローナル抗体であり、そして前記膜表面上の抗体が、該膜表面上に目で確認できる細胞層を形成するのに十分な表面濃度でD及びD^H型のヒト赤血球細胞の両者を結合するのに効果的である請求の範囲第15項記載の構造体。

17. A、B、AB、O、RhD及びRhD^Hの血液型を決定するための血液型検出装置であって；

第1、第2及び第3膜構造体；

約5ミクロンよりも小さな孔サイズを有する、湿潤性、水透過性、非細胞破壊性膜表面、及び前記膜表面に対して置かれた液体サンプルを調節された毛管現象により前記膜表面を通して吸い取るために、

てその細胞が前記膜構造体の内部の前記調節された毛管作用により前記膜を通して吸い取られる場合、赤血球細胞を免疫特異的に結合することができる表面配列の抗-ヒト赤血球細胞抗体をその膜に付着された第4膜構造体及び赤血球細胞に対して免疫特異的な結合親和性を持たないポリマー配列をその膜表面に付着された第5膜構造体をさらに含む請求の範囲第17項記載の装置。

20. 前記抗体が次のようにして次の選択された膜の1つに；

(a) 臭化シアンによってPVDFフィルターに共有的に；及び

(b) PTFE、ニトロセルロース、変性されたナイロン、再生されたセルロース又はセルロースフィルターへの吸収により付着されている請求の範囲第17項記載の装置。

21. 血液サンプル中の赤血球細胞の型を検出するための方法であって；

約5ミクロンよりも小さな孔サイズを有する、湿潤性、水透過性、非細胞破壊性の膜表面、該膜表面と接触される液体サンプルを調節された毛管現象によって前記膜表面を通して吸い上げるための該膜表面に効果的に関連する内部領域、及び選択された型の血液サンプル中の赤血球細胞を免疫特異的に結合

前記膜表面に効果的に関連する内部領域から構成されているそれぞれの膜構造体；

A又はA B型の血液サンプルが前記膜に対して置かれ、そしてその細胞が前記膜構造体の内部の前記調節された毛管作用により前記膜を通して吸い取られる場合、赤血球細胞を免疫特異的に結合することができる表面配列の抗-A血液型抗体をその膜に付着されている前記第1構造体；

B又はA B型の血液サンプルが前記膜に対して置かれ、そしてその細胞が前記膜構造体の内部の前記調節された毛管作用により前記膜を通して吸い取られる場合、赤血球細胞を免疫特異的に結合することができる表面配列の抗-B血液型抗体をその膜に付着されている前記第2構造体；及び

D又はD^H型の血液サンプルが前記膜に対して置かれ、そしてその細胞が前記膜構造体の内部の前記調節された毛管作用により前記膜を通して吸い取られる場合、赤血球細胞を免疫特異的に結合することができる表面配列の抗-D血液型抗体をその膜に付着されている前記第3構造体を含んで成る装置。

18. 前記第3構造体に付着された抗-D抗体が免疫グロブリンMヒトモノクローナル抗体である請求の範囲第17項記載の装置。

19. 血液サンプルが前記膜に対して置かれ、そし

てすることができる表面配列の型特異的抗体を付着された前記膜表面から成る膜構造体を提供し；そしてサンプルを前記膜に接触せしめ；そして

この接触によって、内部の調節された毛管現象の作用による前記膜を通してのサンプル中の赤血球細胞の吸収を引き起こし、それによって型特異性細胞が、前記膜上で赤血球細胞の単層を形成するために、そのような抗体と免疫特異的に反応し；そして

前記膜に非特異的に付着する赤血球細胞を除去するために該膜を洗浄し；そして

血液型の指示として前記赤血球の層の存在を検出することを含んで成る方法。

22. 3種の膜構造体、すなわちA及びA B型の血液に対して特異的な抗-A抗体を有する第1膜構造体、B及びA B型の血液に対して特異的な抗-B抗体を有する第2膜構造体及びD及びD^H型の血液の両者に対して特異的な抗-D抗体を有する第3膜構造体がA、B、AB、O、RhD及びRhD^Hの血液型の決定に使用されるために、提供されている請求の範囲第21項記載の方法。

23. 前記水平寸法が6mm又はそれ以下であり、そして垂直寸法が4.25インチ又はそれ以上である請求の範囲第17項記載の装置。

24. 前記孔サイズが2ミクロンよりも小さい請求

の範囲第7項記載の方法。

25. 前記孔サイズが約0.65ミクロンである請求の範囲第24項記載の方法。

26. 前記装置が、第5図に実質的に例示され、そして説明されている血液型の検出用スティックである請求の範囲第23項記載の装置。

明 細 書

細胞検出システム及び方法

発明の分野

本発明は、吸収された溶液中の細胞と膜表面との接触を可能にする、調節された毛管現象を有する膜構造に関する。この接触は、その膜表面上の親和性領域への細胞の効果的な結合を可能にする。より詳しくは、本発明は、微孔性膜及び支持体への血液細胞の免疫特異的な結合に基づいて、血液の型を検出するシステム及び方法に関する。

発明の背景

細胞の親和性膜面検出は、その表面上の特異的な結合領域への細胞の効果的な結合を必要とする。細胞上の親和性領域、たとえば抗原性領域に対して特異的な抗体は長く知られて来た。しかしながら、親和性膜面による検出は、重大な機械的問題、すなわち親和性領域と細胞（溶液中に比較的低い濃度で存在する）との間の急速な効果的な結合の困難性を有する。検出されるべき細胞がこわれやすい、たとえば赤血球細胞(RBC)である場合、その問題はさらに一層重大である。RBCが破壊するような接触又は条件である場合、その検出は非特異的な着色のために不可能である。他の細胞に関してさえ、溶液中におけるRBCの溶解がしばしば検出装置をひじょうに着

色するので、そのアッセイを非機械的にする。従って、細胞を溶解するための十分な力又は細胞損傷を引き起こす条件を伴わないで、溶液中における細胞を検出する能力は、検出技術に相当な改良点を提供する。大き過ぎる接触力に関するもう1つの問題は、非特異的な結合である。従って、たとえ細胞が溶解しなくても、その結合は、極端に強い毛管現象が存在する場合、非特異的である。

血液細胞の検出

検出装置の1つの共通する設定は、血液の型を決定するように適合されている。受容者が供与者の血液に対して高い免疫学的応答を持たないことを確保するために、それらの2種の血液型を合わせることで、供与者から受容者に血液を供給することにおいて必須である。受容者が供与者の血液細胞の表面抗原に対する抗体を有し、又は抗体を増殖することができる場合、そのような応答が起こり得る。

血液適合性の目的のための最っとも重要な細胞抗原はA及びB抗原であり、これらはヒトの間で4種の主要細胞型：O型（抗原を持たない）、A型（A抗原）、B型（B抗原）及びAB（両抗原）の基礎を形成する。それぞれの細胞型の個体の血清は通常、その個体の血液細胞上に存在しないA及び/又はB抗原に対して向けられた抗体を含む。すなわち、O

型の個体は抗-A及び抗-B抗体の両者を有し、B型の個体は抗-A抗体のみを有し、そして同様である。所望としない免疫応答を避けるためには、供与者の血液細胞がA又はB抗原（受容者がその対応する抗体を有するために）のいづれかを含まないことが必要とされる。

同様にもう1つの重要な抗原基は、赤血球細胞上のD抗原に関係するRh基である。赤血球細胞がD抗原基を欠くRh(-)の個体がRh(+)供与者からの血液を与えられる場合、特にRh(+)血液の後での輸血を与えられる場合、外来性抗原に対する免疫応答は、その外来性細胞と反応することができる抗-D抗体を導びく。

いくつかの他の抗原基、たとえばヒト白血球抗原(HLA)に対する抗体がまた、このシステムを用いて決定することができる。これは二次血液抗原基のための交差適合法であり、そしてそれは、個体が慢性的輸血又はそのような二次抗原への他の連続した暴露を受ける場合にのみ、適切である。

通常の血液銀行操作において、供与血液は、A、B、及びRh型について及び選択された二次抗原について初めにスクリーンされる。主な血液型のための細胞検出法は、細胞凝集反応法によってほとんど行なわれ、ここで供与血液細胞は、試薬抗-A及び

抗-B抗体と共にインキュベートされ、A及び/又はB表面抗原の存在を決定される。凝集反応パターンに依存して、血液はO、A、B又はABとして型を抽出され得る。類似する凝集反応試験を用いて、Rh因子について試験することができる。血液型は、定義された血液群の試薬の赤血球細胞を凝集せしめる、抗原型抗体を欠く供与血清の能力を示すことによって確かめられ得る。

血液型の検出に通常使用される凝集反応試験法は、その試験法においていくつかのタイプの技術的な誤り及び書き誤りを受けやすい。専門家は、アッセイ混合物に誤った試薬又は血液サンプルをうっかりして添加するであろうし、又は凝集反応結果を読み間違えるであろう。書き誤りは、適切な血液容器への血液凝集反応結果を与え際に起こる。これらのタイプの技術的な誤り及び書き誤りは、血液銀行において普通であるが、数百のサンプルが1日に処理される場合、特に避けるのに困難である。

そのような誤りの可能性、及び正しく組合わされた供与体及び受容体の血液型の重要性のために、本発明の血液供与システムは、主な血液型を確かめるために多くのバックアップ検査を含む。すでに示したように、初期の血液型の検出は、供与細胞の凝集反応、及び既知タイプの試薬細胞の血清凝集反応によ

るその血液型の確認を含む。血液が血液銀行を離れる前、主な血液型の群(O、A、B、AB、及びRh)が、初めのアッセイをくり返すことによって確かめられる。その主な血液群は、供与血液が病院又は診療所によって受け取られる際、再び検査される。正しい供与血液型を確かめるために必要とされる二重検査は、比較的費用が高く、そして血液を供給する血液銀行及び血液を受ける両者にとって時間がかり過ぎる。

細胞型の特異的抗体により被覆された固体表面に結合する免疫特異性細胞に依存する細胞型検出法がまた、提案されて来た。1つの方法においては、血液細胞がまず、加水分解酵素により消化され、表面に結合されている抗体への細胞結合を妨げる表面の群が除去される。その酵素処理された細胞を洗浄し、希釈し、選択された抗-血液群抗体により被覆されたマイクロ力価ウェルに添加し、そしてそのマイクロ力価プレートを選心分離し、それぞれのウェルにおいて抗体により被覆された表面に対して細胞を向ける。陽性反応は、ウェル表面の被覆された部分上に単層の細胞を生成し、そして陰性反応は、ウェルの底で分離した細胞ペレットを生成する。単層細胞の存在は、ペレット化された細胞の領域の外のウェル中の単層領域を通して405nmで単色光線の吸収

度を読むことによって確立される。[Singer, L.T., など., *Transfusion* (1985) 25: 21]。

もう1つの固相法がアメリカ特許第4,275,053号に開示される。この方法に使用される固相支持体は、選択された細胞表面抗原型を有する細胞を支持マトリックスに裏返し付着せしめ、次にその付着された細胞に抗原特異性抗体を結合することによって調製される。選択された表面抗原を有する血液サンプルの存在において、抗体は、サンプル中の懸濁された細胞を結合し、標準の計測法、たとえば濃度走査法によって検出される分析物細胞の単層を形成する。ヨーロッパ特許出願第84106844号(公告番号第130,434号)は、血液群の抗原に対して特異的な、固体ラッカーフィルムにおけるモノクローナル抗体の使用を開示する。血液型を検出する他の特許又は出版物は、次のものである: USP 2,770,572; USP 4,200,690; USP 4,246,339; 及び USP 4,407,943; PCT WO85/01354; 及びヨーロッパ特許出願第81108009号(公告第51,748号)。

血液型を検出するためにこれまで使用されて来た多くの方法は、血液細胞のペレット化及び血液細胞と抗体との接触を促進するために遠心分離の使用を必要とした。そのような段階は、複雑な遠心分離装置を必要とし、そしてさらに、血液型の検出過程の

間に生じる誤りの可能性を高める。さらに、そのような血液型の検定法は手間がかかり、そして、血液型を決定するための相当な技術的練習を必要とする。

固相血液型検出法は、固体表面上での単層の細胞の弱い色素反応のために、制限された信頼性を有する。また、その単層の細胞は機器分析のために適切な脱水形で便利に保存され得ないので、元の血液群の型の検出を確かめるための方法は、単にそのアッセイを再び起なりことである。本発明は、弱い色素反応、容易な使用及び便利な保存の問題を、親水性マトリックス中に水性相を吸上げ、それによって暴露された抗体と赤血球細胞とを効果的に接触せしめる、水透過性非細胞破裂性膜を用いる乾燥又は乾燥に近い膜構造を使用することによって解決する。

発明の要約

膜構造体上の親和性領域と細胞との効果的な接触によって、溶液中における細胞の検出に使用するために調節された毛管現象を有する膜構造体を調製するための新規方法が記載されている。その膜表面は、その内部への細胞の浸入を許さない。

この方法の1つの用途は、技術的誤り又は書き誤りの可能性及びそれによって、血液型の複数検査の必要性を大まかに除去する血液型検出システムを提供する。この血液型検出システムは、血液細胞を含

も液体と接触される場合、血液細胞と膜に結合されたタイプ特異性抗体との間の強い接触を引き起こす凝潤性の水透過性マトリックス中にその液体を吸上げる乾燥膜構造体を含んで成る。この乾燥膜構造体は、調節された毛管現象又は吸収作用によって、水性相の材料を膜中に正確に吸い取り又は吸い上げ、それによって、細胞を破壊しないで又は細胞を非特異的にトラッピングしないで、その細胞と特異的な抗体とを効果的に接触せしめる、水透過性吸上げ材料と一緒に膜表面を提供する。

図面の簡単な説明

第1図は、固体支持体(10)、微孔性で水透過性非細胞液性膜表面、及び該膜表面(12)、任意のスパーサー(14)及び型特異性抗体(16)と関連する調節された毛管現象を有するように処理された内部領域を含むインジケーター膜支持性構造体を例示する。

第2図は、赤血球細胞を含む水性液体との接触の後、膜一表面一内部層(12)が液体を吸収し、そして赤血球細胞(18)が特異的な型の抗体(16)に結合している、第1図のインジケーターを例示する。

第3a及び第3b図は、A、B又はD型(又はD^u)の血液抗原及び陽性及び陰性対照に対する特異

的抗体を担持する膜領域を含む血液型検出スティックを例示する。

第4図は、A、B、D型(又はD^u)及び対照領域C⁺(抗-RBCを含む)並びに中性ポリマーを含む領域C⁻に対する特異的抗体を担持する膜一表面一内部領域を含む血液バッグのタグを例示する。

第5図は、A、B、D(又はD^u)、対照領域C⁺(抗-RBCを含む)及び非-RBC結合阻止ポリマーを含む対照領域C⁻に対する抗体を担持する色をロードされた膜領域を含む血液型検出スティックを例示する。

発明の特定の記載

調節された毛管現象を有する乾燥又は低湿乾燥状態の膜検出器システムが、血液型の検出のためにその膜システムを適合する例と共に記載される。ヒトのABO型及びRh型を決定するためにそのような血液型検出システムを使用する方法が例示される。

1. 調節された毛管現象

膜検出器装置は、正しい機能のために調節された毛管現象を必要とする。吸着性の多孔性材料が、2段階の過程を通して、調節された毛管現象を有する材料を生成するために変性される。その第1段階は、適度な親水性特徴を示す、すなわち中ぐらいの速度で液体を吸収するであろう基礎膜を選択することと

ある。第2段階は、その基礎膜材料の毛管作用を効果的に制御する化学薬剤によるその膜の被覆である。そのような被覆剤の1つの例として、その基礎膜をわずかに疎水性にし、それによって毛管現象を調節するポリマーを挙げることができる。そのような特性を有する多くのポリマーが被覆材料として使用するために予期されるが、タンパク質、たとえば血清アルブミン、又は有機ポリマー、たとえばポリ塩化ビニル(PVC)及びポリビニルピロリジン(PVP)が好ましい。これらの被覆材料は水に溶解され、そして多孔性吸着材料の調節された毛管現象をもたらすのに十分な濃度で適用される。その被覆溶液の容量は、過剰の乾燥、固化、被覆又は毛管作用による液体の多孔性材料への一定の吸収又は吸上げの妨害を伴わないで、その吸着性膜材料じゅうへのポリマー、塩及び界面活性剤の均一の分配を引き起こすのに十分であるべきである。

ポリマーの他に、被覆溶液は塩及び界面活性剤を含む。その塩濃度は、等張食塩水の濃度と同じか又はわずかに低くあるべきである。それは、ひじょうに急速な水の取り込みによって細胞膜の破裂を引き起こさないであろうナトリウム、カリウム、カルシウム又は他の塩であり得る。膜の水和化に基づいて、水がその膜中に取り込まれ又は吸上げられ、その膜

内部にほぼ等張の環境をもたらし。

界面活性剤は、局部領域における塩又は溶解された材料の有害な付着を伴わないで、膜表面及び多孔性内部の一定の被覆を促進するために前記被覆溶液中に導入される。いずれの界面活性剤でも使用され得るが、好ましい界面活性剤は、追加成分として塩及びポリマーと共に、0.01~1%溶液(最っとも好ましくは0.1%体積/体積の濃度)でのTween 20(Sigma Chemical Co.)である。

調節された毛管現象を作り出すための被覆溶液中におけるポリマーの適切な濃度は、ウシ血清アルブミン(BSA)、ポリビニルピロリジン(PVP)及びポリビニルアルコールのために決定された。5~30%のBSA(W/V)の溶液を配合し、そしてそれぞれの溶液2~20 μ lを6 \times 6 \times 6mmの膜(ImmobilonTM)に適用した。被覆のための最適なBSA濃度は1.7%であり、そしてその4 μ lが適用された。PVPのためには、10~40%を含む溶液が、6 \times 6 \times 6mmの膜(ImmobilonTM)に適用された。2~20 μ lのサンプルを、それぞれの表面に適用し、そして最適な被覆は25%PVP及び4 μ lの体積で生じた。PVAのためには、3~20%の溶液が調製され、そして6 \times 6 \times 6mmの膜(ImmobilonTM)に適用された。適用されるサンプルは2~20 μ lの溶液であった。最適な

被覆は、12%のPVA及び膜当り4μlで生じた。

被覆溶液中の塩は、いづれかの非妨害性塩であることができるが、しかし好ましくは塩化ナトリウム又は塩化カリウムである。その濃度は等張又はわずかに低い等張状態である。界面活性剤は、膜表面及び膜の多孔性内部（又は他の多孔性材料）の被覆を促進するために被覆溶液の一部として適用される。界面活性剤の使用は、被覆材料の付着又は被覆を伴わないで、膜の表面及び内部じゅうにポリマー及び塩の均一の分配を促進する。

使用する場合、親和性リガンド（抗体、抗原、ホルモン、レセプター、タンパク質、等）が膜に結合された後、ポリマー、塩及び界面活性剤を含む被覆溶液が適用される。被覆溶液の体積は、吸収性材料の内部体積をちょうど満たすべきである。1つの例において、膜は6mm×6mm×140μmであり、そしてその内部体積は、70%空隙率であり、被覆は、溶解されたポリマー、塩及び界面活性剤の適切な分配を得るために約4μlの体積を必要とする。それぞれの新規の膜設計のためには、必要とされる実際の量は、それがもはや完全に吸収されなくなるまで、多量に溶液を適用することによって決定され得る。

2. ABO血液試験のためのアッセイシステム

A. 膜構造体の調製

供し、又は提供するために変性され得る。同様に、結合はまた、エーテル結合を通して存在する。例I-IVに記載されている支持体を調製するのに使用される1つの好ましい支持体材料は、化学的に活性化された親水性の微孔性膜、たとえばMillipore CorporationによるImmobilon™（これに抗体が共有結合され得る）である。

Immobilon™膜の基礎膜材料は、非相互反応性フルオロカーボンポリマーである。しかしながら、細胞の浸入を排除し、そして本来の活性を保持するが、タンパク質又は他の親和性物質の固定化を可能にするいづれかの膜でも十分であろう。Immobilon™膜の孔サイズは、0.65 μm～5 μmの範囲である。

親水性の微孔性膜は、毛管現象によって調節される適切な速度で水性相を吸収するように調節されるべきである。吸収の速度は、塩、たとえばカリウム又はナトリウム塩の添加によって、及び非特異的ポリマーの添加によって調節される。表面の電荷又はpHはまた、結合に影響を及ぼすことができる。水吸収の速度がひじょうに早い場合、それは細胞の非特異的結合又は細胞破裂をもたらす、次に非特異的ポリマーが増大せしめられ、それによって水吸収の速度を高める。

血液群の決定を行なうための好ましい温度は室温、

血液アッセイシステムにおける膜構造体は、選択された赤血球細胞表面抗原に対して特異的な表面に付着された抗体を有する支持体から成る。

その膜構造体を調製するのに使用される支持体は、(a)膜構造体中への液体相の吸上げ；(b)その支持体表面への抗原特異性抗体の結合；(c)その結合された抗体への赤血球細胞の免疫特異的結合；及び(d)膜マトリックス中の塩、非特異的なタンパク質濃度又は電荷を変えることによって、膜構造体による水吸収の速度の調節を可能にするものである。種々の材料、たとえば多くのポリマー及びガラスが、膜の支持構造体のために適切である。代表的なポリマー材料は、ラテックス、ポリカーボネート、ポリビニルジフルリド(PVDF)、セルロース、ナイロン、ポリ酢酸ビニル、ポリスチレン及びポリエチレンを含む。その膜支持材料は、他の支持体形、たとえばビーズ又はロッドも使用され得るが、下記に評価されるであろうように、好ましくは、小さなパッチ又はパッド、たとえば2～8mmの円形、正方形、等に切断され得るシート又は膜である。その支持体は、表面の化学基、たとえばカルボキシル、ヒドロキシル、アルデヒド、スルホヒドリル、アミド又はアミン基（これらは、抗体をその支持体に結合することによって使用される化学的な共有結合に関係することができる）を提

士5℃である。しかしながら、脂質成分に富む血液の存在において、その最適温度は、高く、30～40℃又はそれ以上の範囲である。高温は、脂質相によって引き起こされる血液成分の高められた粘度のために必要とされる。

親和性領域の中に、いづれかのリガンド/リガンドレセプター、たとえば抗体-抗原、ホルモン-レセプター、酵素-基質又はお互い結合親和性を有するいづれか2種の分子手段（溶液中における1つの手段及び膜に結合されている他の手段）が存在し、それによって溶液中における細胞の検出可能な単離を促進する。

支持体に結合された細胞特異性抗体は、通常、選択されたヒト赤血球細胞抗原、及び特定にはA、B、及びRh(+)ヒト血液群に関連するA、B、及びD細胞抗原に対して特異的であるマウス又はヒトIgM又はIgG抗体である。ヒト血液群のA、B群に対して特異的なマウス及びヒトIgM抗体は、一部精製された抗血清として又は精製された形で、商業的に入手可能である。Rh-関連の抗原への結合のための抗-D抗血清又はモノクローナル抗体もまた、商業的に入手可能であり、そしてその抗-D抗体は既知の方法によってさらに精製され得る。その抗体はポリクローナル又はモノクローナルのいずれかであり

得る。

抗体の結合は、カップリング剤、たとえばグルタルアルデヒド、カルボニルジミダゾール又はトリクロロトリアジンの使用により当業界で既知の方法によって行なわれ得る。

Bethell, G.S., Ayers, J.S., Hancock, W.S. 及び Hearn, M.T.W. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**: 2572~2574.

Zuk, R.F., Ginsberg, V.K., Houts, T., Rabbie, J., Merriek, H., Ullman, E.F., Fisher, M.M., Sisto, C.C., Stiso, S.N., Litman, D.J. (1985) *Clin. Chem.* **31**: 1144~1150.

典型的な方法においては、抗体タンパク質は、支持体表面上の反応性化学基によって膜支持体に共有結合される。その結合は、反応性表面基、たとえばアルデヒド基及び適切なタンパク質基、たとえば第一アミンの間の直接的な化学結合を含むことができ、又は適切な二官能価の結合試薬、たとえばグルタルアルデヒドによる架橋を含むことができる。種々の既知の結合反応が利用できる。他方、いくつかの支持体材料に関しては、二次抗体は、共有結合によらないで支持体に強く吸着され得る。いづれの方法においても、支持体は、結合反応の後、結合されなかった材料を除去するために十分に洗浄される。結合

ら成る。すでに抗体を担持する膜の支持成分への接着性集成は、水吸収の予期できない速度をもたらし、それによって赤血球細胞の非特異的結合の可能性又は赤血球細胞の溶解を高める。

第1図は、水透過性膜(12)、化学的リンカー(14)及び抗体(16)と共に支持体(10)を例示する。いづれか二官能価の化学物質又はポリマーが、リンカーとして使用され得、又はリンカーは使用されなくても良い。第2図は、細胞、たとえば赤血球細胞に概略的結合される抗体(16)に膜に結合されるリンカー(14)に結合される膜(12)に隣接する支持体(10)を例示する。それぞれの細胞は、それを膜支持体装置に保持するために複数の抗体によって結合される。細胞に結合する抗体の数は、洗浄過程の間、それを保持するのに十分な数、好ましくは細胞接触表面領域当たり抗体分子20又はそれ以上である。

第3a、3b及び4図は、第1及び2図に関して記載された型の膜パッド領域を含むスティック(20)又はタッグ(33)を示す。1つの態様において、その寸法は6mm×6mm×140μ(70%の空隙率)である。A、B及びDで示された3種の膜は、それぞれ血液群A、B及びD(Rh)に対して特異的な表面抗原を有する。4及び5種の膜は、すなわち

されなかった抗体材料を除去するために洗浄した後、残る活性タンパク質結合性部位を、他のタンパク質又はポリマー性材料の添加によって阻止することができる。このタンパク質又はポリマー材料は、抗体によって結合されないそれらの結合部位に結合し、それによって試験材料におけるタンパク質の非特異的結合を減じ又は除去する。そのようなタンパク質群の1つは、血清の非免疫グロブリン成分、たとえばα-2-マクログロブリン及びアルブミンである。これらのタンパク質は、結合反応及び阻止反応を同時に完結するために抗体を伴うことができる。そのような阻止のために有用なもう1つのタンパク質は、乳タンパク質カゼイン又は検出されるべき抗原のために選択性を持たないいづれか他のタンパク質である。

膜材料自体、たとえばImmobilon™は水吸収性であり、又はそれは、いづれかの水吸収性材料、たとえば紙又は親水性ポリマーの膜であり得る。

膜及び支持成分を集成するための1つの好ましい方法は、まず、両面接着剤の使用によって膜成分を支持成分に結合し、続いて特異的抗体を結合し、そして調節された毛管現象として選定された速度でその膜表面抗体と血液細胞とを接触するために適切な速度でその膜が水を吸収するように調節することか

抗-RBC抗体を含む陽性の対照及び非特異的抗体又は非抗体タンパク質もしくは他のポリマーを有する陰性の対照が、場合によっては存在し得る。支持体は別々の膜上に形成され、そして接着剤によってタッグに接着され得、又はタッグ自体が、5種のパッド領域が形成される膜であり得る。タッグは、好ましくは、その膜支持体上に展開される血球細胞のマトリックスとの色の対照を高めるために、白色又は薄く着色されたものである。

第3a図は、抗-A抗体領域(25)、抗-B抗体領域(24)、抗-D抗体領域(23)、すべての赤血球細胞に対する抗体を担持する陽性の対照パッド(22)、及び赤血球細胞のための選択性を持たない中性タンパク質又はタンパク質を担持する陰性の対照パッド(21)である5種の膜パッド領域を有するスティック(20)を例示する。第3b図において、パッド領域28、29、30及び31は、小はん点を付けられ、そして赤血球の結合を示す。これは、血液型がAB陽性であり、そしてアッセイが陽性の対照(28)を有することを示し、そして透明な陰性の対照(27)は赤血球細胞の非特異的吸収を示す。それぞれのパッドは、赤血球細胞表面抗原に対する抗体の種々の選択性を補うために、水吸収の速度について個々に調整され得る。すなわち、

水吸収の速度が早くなるほど、細胞表面抗原と親和性抗体とのより低い有効的な接触が必要とされ得る。

タグは、好ましくは内容物の血液型を同定する容器上にタグを提供するために血液容器に張り付けるために企画されている。第4図においては、血液型の同定カード、たとえばバッグの横に接着されたタグ(33)の部分が示されている。そこに示された特定のカードは、B/Rh(+)の血液型を示す。カード上の血液群の決定アッセイを行なう方法が下記に記載されるであろう。

試験される血液群の抗原よりも他の細胞表面抗原に対して特異的である可溶性抗体がまた、本発明の方法の細胞型を捜出するために使用され得る。1つのそのような方法は、ヒト白血球抗原(HLA)特異性抗体を用いることである。そのような抗体を調製するための方法は良く知られている。

に結合される抗-ヒト血液型抗体を担持する膜-吸上げ領域(22~25)から成る。第3b図においては、結合された赤血球細胞が、膜によって又は真空装置によって容易に検出される密集した細胞層(28~31)を形成する。

洗浄された支持体は、乾燥せしめることによって、強く着色された乾燥マトリックス領域を有する永久的な形に保たれ得る。所望により、その乾燥された支持体(又はカード上の支持領域)は、吹付用ラッカー又は同様のものにより保護され得る。

本発明の方法が、例示的に血液銀行によって行なわれる場合、供与血液が血液バッグ、たとえばバッグ(32)(第4図)に集められる。次に、このバッグからの血液を、タグ(33)の支持体領域に適用する。室温で1~3分間インキュベーションした後、生理食塩水によりタグをすすぐことによって、又はそのような溶液中にタグを浸し、そして強く攪拌することによって、カードを洗浄する。すぐに、タグは、強く着色された領域(ここで、免疫特異的な細胞結合が起っている)及び陰性領域のための実質的に着色されていない領域を示す。例示された態様において、アッセイはAB/Rh(+)血液型を示す。カードは、乾燥せしめられ、容易に読みやすい永久的な血液型の記録を与えられる。そのカ

3. 血液型アッセイ方法

本発明の方法は、選択された細胞表面抗原、典型的には血液群A, B, 又はRh因子の特性を示す抗原を有する赤血球細胞に特異的に結合し、且つ高い親和性を有するように構成される、上記型の膜支持体の提供をまず含む。その膜は、膜内への水性相の吸上げを促進するために使用される場合、乾燥又はほぼ乾燥状態であるべきである。

型を検出されるべき完全な血液又は血液細胞のサンプルが、膜をおおひのに十分な量、それぞれの膜に添加され、そしてその膜は懸濁されたサンプル細胞に暴露される。他方、その膜を担持するスティック又はタグがそのサンプルに浸される。比較的少ない細胞を含む希釈されたサンプルにおいては、より厚い膜が、その膜表面と必要とされる数の細胞とを接触するために、より多くの量の溶液の吸収を必要とされる。たとえば、サンプルがN回希釈された場合、その関連する内部の吸収領域はまた、約N倍、上昇されるべきである。

第3b図は、膜が水溶液又は完全な血液溶液中における細胞に暴露される場合に生じる膜を担持する診断用スティックへの細胞の結合を例示する。第3b図における診断用スティックは、支持体(20)、及び第1, 2及び3a図におけるようにして膜表面

ードは、血液供与設定において、たとえばステープルで留め、締付け又は接着性基材によって血液容器に永久的に接着され得る。血液受容の場合、カード又はストリップが、受容者の病院の記録に又はプレスレットの形で患者に直接的に取り付けられ得る。

細胞検出膜システムの多くの態様が予想される。予想される哺乳類細胞の中に、ヒト及び他の哺乳類、たとえば馬、牛、羊、ヤギ、豚、犬、ネコ、ウサギ、ネズミ及びマウスの血液細胞；及び真核性組織培養細胞系が存在する。細胞がそれ自体の固有の特性、たとえば赤血球細胞のための赤色によって検出できる場合、追加の薬物が検出のために必要とされる。しかしながら、細胞が十分に検出され得ない場合、薬物、たとえば染料、検出できるラベルされた抗体又は検出できるラベルされた親和性リガンドが使用されるべきである。検出できる薬物の中に、放射性同位体、色素、蛍光染料及び電子不透明材料が存在する。

細胞検出装置の一般的態様は、第1~5図に例示され、そして特定の検出器が第5図に示されている。その細胞検出支持装置は、検出を妨害しないいづれかの材料提供支持体であり得る。検出器は、パッド、スティック、タグ、プレスレット、カード又は容易な利用性且つ製造のために適切な他の態様を含む

種々の形で存在することができる。

第5図に示されているような特定の態様は、特定の型の赤血球細胞を検出するために適切な膜表面を有する細胞検出器である。その診断用ストリップは、血液容器中への挿入のための手で持つために適切な支持ストリップ(44)から成る。予定されるその寸法は長さ2~6インチ、好ましくは3~5インチ、及び最つとも好ましくは4.25インチである。その幅は2~15mm、好ましくは3~9mm、及び最つとも好ましくは6mmである。例1に記載されているような抗体凝和性領域を含む膜表面が支持体に取り着けられている。この態様において、血液型の検出装置上に次の明確な領域が存在する：溶液の底部での沈殿物が検出を妨害しない確保するために膜を持たない領域(34)；ヒトD又はD^uに対する抗体を有する膜を含む領域(35)；灰色の文字"Rh"又は灰色のバックグラウンド及び異なった色の文字を有する領域(36)；ヒトB抗原に対する抗体を有する膜を含む領域(37)；黄色の文字"B"又は黄色のバックグラウンド及び異なった色の文字を有する領域(38)；ヒトA抗原に対する抗体を有する膜を含む領域(39)；青色の文字"A"又は青色のバックグラウンド及び異なった色の文字を有する領域(40)；オープンスペースの領域(41)；

対照目的のための膜である領域(42)及び(43)（1つは赤血球細胞を非特異的に結合する抗体を含む陽性の対照膜であり、そして他は赤血球細胞のための特異的な凝和性が存在しないような陰性対照を有する陰性の対照膜である）。スティック上の膜の順序は変えることができ、膜及び文字の大きさは変えられるが、しかしながらそれらの色は、本発明の態様の臨界的な観点である。血液型の検出のための診断用スティックのユニークなデザインは、21 CFR Section 660.28に従って、調節された毛管現象及び色の指示薬を有する膜を具体化する。

本発明の他の態様は、ピンク色の"C"、褐色の"E"、オレンジ色の"CDE"、薄紫色の"C"又は緑色の"O"；又は文字に対して異なった色を有する類似する色のバックグラウンドを有する指示領域を有するであろう。

前記から、いかに種々の本発明の目的及び特徴が満たされるかを正しく評価することができる。この血液型検出システムは、血液サンプル又は試薬中における混合による技術的な誤差の可能性を実質的に除去する。第4図に例示されている本発明の態様において、血液サンプルは、血液バッグ又はサンプルからカードに直接的に移され、そしてそのカードに添加される試薬のみが生理食塩水により洗浄される。

血液型の視覚による記録がカード自体上に含まれるので、書き取りは最少にされる。

これまでに提案された他の血液型検定法とは異なる、本発明の結合反応は、すなわち特定の分光光度計又は濃度計装置なしに、及び複雑な説明又は分析なしに容易に視覚的に読まれる。

本発明のもう1つの重要な利点は、初めのアッセイがそのアッセイ結果の永久的な記録を提供し、その結果、再試験が血液型を確認するために必要とされないことである。

次の例は、限定するものではなく、むしろ本発明の特定の態様を例示する。

実施例

例 I

抗-A、抗-B又は抗-D抗体を有する膜の調製
支持又は基材材料のシートに、両面接着剤(ImmobilonTM, Millipore Corporation; Adhesives, 3M Corporation)の使用により膜材料の一連のストリップを適用する。A、B又はDヒト血球細胞抗原に対する抗体は、商業的に入手可能である(Gamma Biologicals, Inc., Houston, TX)。これらの抗体は天然でモノクローナル又はポリクローナルのいずれかであり得る。支持体表面への膜の適用に続いて、5段階：結合、染色、被覆、乾燥及び貯蔵が存在す

る。

第1段階において、リン酸緩衝溶液中における抗体+任意の不活性タンパク質又はポリマー、たとえばα2-マクログロブリンを、膜に適用する。抗体を含むこの液体約10μLを、膜の6mm²の面積当りに適用する。その抗体溶液は、10μL当たり0.05μg~0.5μgの抗体を含む。存在する場合、ポリマー又はタンパク質の濃度は、約100μg/10mm²である。抗体の結合の前、その膜表面は必要なカップリング剤により処理された。膜への抗体の結合に続いて、27℃で20分の乾燥期間又は乾燥するまでより長い期間が存在する。乾燥期間が完結した後、次の段階は、調節された毛管現象を作り出すための膜の被覆である。毛管現象を調節するために、塩、界面活性剤及びポリマー、たとえばタンパク質又は他のポリマーを含む被覆溶液を適用した。脱イオン化された水において2.0%BSA、界面活性剤Tween 20及び塩化ナトリウムを含む1つのそのような被覆溶液を、使用した。この被覆溶液のサンプル5μLを、膜のそれぞれ6mm²面積に適用した。

被覆段階の後、その被覆された膜は、37℃で20分間又は乾燥まで乾燥せしめられた。

例 II

診断用スティックの調製

次にその処理された膜を担持するシートを、6mmの幅のストリップに切った。次に、これらのストリップを、必要とされるまで、乾燥、冷却又は凍結条件下で保存した。ストリップ上のそれぞれの膜領域は、6mm×6mm×140μの膜領域及び3.5～5μLの内部体積を有した。

ヒト抗原A、B及びDに対する抗体溶液により処理された膜を担持する支持体シートを、幅6mm又はそれ以下及び長さ4.25インチ又はそれ以上のストリップに切断した。次に、これらの切断されたストリップを、乾燥剤を含む乾燥容器に保存した。それらは、冷却又は凍結条件下で維持され得る。必要とされる場合、その診断用ストリップを使用のために取り出す。

例 III

診断用タッグの調製

診断用タッグを、例Iの方法に類似する方法によって調製する。但し、抗体溶液及び被覆溶液が支持体基材に接着された膜ディスクに適用される。その支持体基材は、容器、プレスレット又は記録への適用のために適切な接着性基材をその反対側に有する。

を示す。

	第 1 表							
	血液型							
	A+	A-	B+	B-	AB+	AB-	O+	O-
抗-A	+	+	-	-	+	+	-	-
抗-B	-	-	+	+	+	+	-	-
抗-D	+	-	+	-	+	-	+	-
抗-RBC(C+)	+	+	+	+	+	+	+	+
負の対照(C-)	-	-	-	-	-	-	-	-

中：+ = 赤；- = 白

従って、第1表の結果は、調整された毛管現象を有する膜装置を用いての哺乳類の赤血球細胞の検出を示す。

例 IV

A、B、AB、O又はD血液型のための試験

A、AB及びO群の供与者からの完全な血液を、地方の血液銀行から得た。

例I及び例IIのようにして調製された、膜表面に結合されたマウス抗-ヒト血液型A、B、D及びRBCを有する個々の膜診断用スティックを、60秒間、完全な血液を有する試験管中にそれぞれ配置した。次に、その診断用スティックを取り出し、そして生理食塩水(約5～10ml)により洗浄し、又は生理食塩水を満たされた試験管(30～50ml)中に10～30秒間、浸した。次に、その診断用スティックを読んだ。

膜の視覚的な検査は次のことを示した：

(a) A及びAB血液型は、表面に結合された抗-A抗体を含むディスク上に強い着色反応(膜表面被膜)を与え；

(b) B及びAB血液型は、表面に結合された抗-B抗体を含むディスク上に強い着色反応を与え；

(c) 抗-A又は抗-B膜のいずれかへのO血液型の評価可能な血液細胞の結合は、検出されなかった。

第1表は、A+、A-、B+、B-、AB+、AB-、O+及びO-ヒト血液に関する試験のための結果を要約する。第3a及び4図は、AB+のためのパターン

FIG. 1

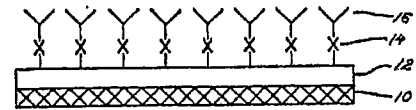


FIG. 2

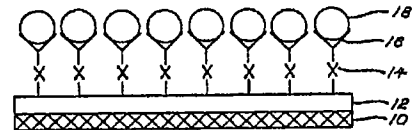


FIG. 3a

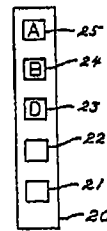


FIG. 3b

